

免疫荧光细胞化学染色联合激光扫描共聚焦显微技术对脑膜癌病的诊断价值

窦春阳 范学文 吴若芬 朱海清 陈桂生 孔繁元

【摘要】 目的 探讨免疫荧光细胞化学染色与激光扫描共聚焦显微技术联合检测在脑膜癌病诊断中的价值。方法 采用免疫荧光细胞化学染色法,以小鼠抗人单克隆上皮膜抗原(EMA)标记脑膜癌细胞及对照组脑脊液细胞,激光扫描共聚焦显微技术获得脑膜癌细胞扫描图像并定量检测上皮膜抗原相对荧光强度。结果 上皮膜抗原主要表达于脑膜癌细胞的细胞质和细胞膜,着红色荧光,相对荧光强度为 (44.84 ± 13.05) ,与对照组 (3.98 ± 1.58) 相比差异有统计学意义($t = 43.954, P = 0.001$)。免疫荧光细胞化学染色联合激光扫描共聚焦显微技术对上皮膜抗原的检测阳性率为 90% (18/20),高于常规 MGG 染色法 [60% (12/20)],组间差异具有统计学意义($\chi^2 = 4.800, P = 0.010$)。结论 免疫荧光细胞化学染色与激光扫描共聚焦显微技术联合检测脑脊液细胞上皮膜抗原表达变化,可为脑膜癌病的诊断、组织来源提供实验室依据。

【关键词】 脑膜肿瘤; 脑脊髓液; 肿瘤转移; CA-15-3 抗原; 显微镜检查,共焦; 荧光免疫测定

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2011.05.012

Evaluation of immunofluorescence cytochemical staining and laser-scanning confocal microscopy in the diagnosis of meningeal carcinomatosis DOU Chunyang, FAN Xuwen, WU Ruofen, ZHU Haiqing, CHEN Guisheng, KONG Fanyuan. The Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China

Corresponding author: FAN Xuwen (Email: nxfxw@163.com)

【Abstract】 Objective To explore the value of combination of immunofluorescence cytochemical staining (ICS) and laser-scanning confocal microscopy (LSCM) in the diagnosis of meningeal carcinomatosis. **Methods** ICS and LSCM were used to detect the cellular distribution and quantity of epithelial membrane antigen (EMA) in cerebrospinal fluid (CSF) cells of patients with meningeal carcinomatosis (MC group) and controls (control group). **Results** The EMA was expressed with red fluorescence in the cytoplasm of meningeal carcinomatosis cells. The mean fluorescent intensity of cellular EMA in meningeal carcinomatosis cells of CSF in MC group (44.84 ± 13.05) was significantly higher than the cells of CSF in control group ($3.98 \pm 1.58; t = 43.954, P = 0.001$). The positive rate of routine cerebrospinal fluid cytologic examination (May-Grunwal-Giemsa staining) and EMA immunofluorescence examination combined LSCM was 60% (12/20) and 90% (18/20), respectively, the difference was significant ($\chi^2 = 4.800, P = 0.010$). **Conclusion** The combination of immunofluorescence cytochemical staining and LSCM for the detection of EMA expression changes in cells of CSF is useful for the diagnosis and differential diagnosis of meningeal carcinomatosis.

【Key words】 Meningeal neoplasms; Cerebrospinal fluid; Neoplasm metastasis; CA - 15 - 3 Antigen; Microscopy, confocal; Fluoroimmunoassay

脑膜癌病(MC)是中枢神经系统转移瘤的一种

基金项目:宁夏自然科学基金资助项目(项目编号:ZN0791)

作者单位:750004 银川,宁夏医科大学临床医学院诊断学系(窦春阳);宁夏医科大学总医院神经内科(范学文、陈桂生、孔繁元),脑脊液研究室(吴若芬);南京医科大学附属脑科医院病理科(朱海青)

通信作者:范学文(Email:nxwxw@163.com)

特殊分布类型,多因颅外恶性肿瘤转移或颅内原发肿瘤向脑膜浸润所致。目前脑脊液细胞学检测是诊断脑膜癌病的主要方法,但在病变早期常规细胞学检测对细胞良恶性质的鉴别较为困难,容易误诊或漏诊。我们采用免疫荧光细胞化学技术和激光扫描共聚焦显微技术(LSCM)对 20 例脑膜癌病患者脑脊液中的肿瘤细胞上皮膜抗原进行检测,以探讨

联合检测方法在脑膜癌病诊断中的应用价值。

材料与方 法

一、材料

1. 标本来源 (1) 脑膜癌病组: 20 例诊断明确的脑膜癌病患者均为 2007 年 8 月-2008 年 8 月宁夏医科大学附属医院神经内科、神经外科, 以及南京医科大学附属脑科医院门诊及住院病例, 男 9 例, 女 11 例; 年龄 9~70 岁, 平均 51 岁。所有患者均符合以下入组条件: 有颅内高压、脑膜刺激征等神经系统症状与体征; 头部 MRI 和 CT 增强扫描可见转移瘤病灶及脑膜强化或未见异常; 脑脊液常规细胞学检测有大量异形细胞; 既往有或无恶性疾病病史; 排除中枢神经系统白血病及淋巴瘤患者。(2) 对照组: 20 例均为宁夏医科大学附属医院神经内科住院, 且经脑脊液细胞学检测诊断为非癌性颅内感染患者, 男 8 例, 女 12 例; 年龄 18~62 岁, 平均 41 岁。

2. 试剂与药品 免疫试剂中 I 抗为小鼠抗人 EMA 单克隆抗体(工作浓度: 1:100), 购自美国 USCNLIFE 公司; 四甲基罗丹明异硫氰酸(TRITC) 标记的山羊抗小鼠 IgG II 抗(工作浓度: 1:40) 由北京博奥森生物技术有限公司提供; 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI) 染色液(工作浓度: 1:1000) 为美国 Sigma 公司产品。

3. 实验仪器 Cytospin-3 型细胞玻片离心仪为英国 Shandon 公司产品。TCS-SP5 型激光共聚焦扫描显微镜为德国 Leica 公司产品, 由解放军第三军医大学提供使用。

二、实验方法

1. 标本制备与保存 脑膜癌病组 20 例标本中 17 例经腰椎穿刺术采集脑脊液, 3 例于手术中获取脑室液; 对照组 20 例脑脊液标本均采集于腰椎穿刺术。所有患者的脑脊液标本均经细胞玻片离心仪以 800 r/min 离心 4 min, 共制备 4 张玻片, 1 张行迈-格-姬(MGG) 染色以观察细胞形态; 其余 3 张经 4℃、体积分数为 100% 的丙酮溶液固定、塑料薄膜密封后置 -80℃ 超低温冰箱保存备用。

2. 上皮膜抗原标记 (1) 标记方法: 以已知肺腺癌胸腔积液标本作为阳性对照组、磷酸盐缓冲液(PBS) 为自发荧光对照组、PBS+II 抗为荧光标记物对照组。低温冻存玻片拆去塑料薄膜, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min($\times 3$), 体积分数为 10% 的正

常山羊血清封闭 30 min, 磷酸盐缓冲液冲洗后滴加小鼠抗人 EMA 单克隆抗体(I 抗), 置湿盒内 37℃ 孵育 1 h, 4℃ 过夜, 磷酸盐缓冲液冲洗后滴加 TRITC-山羊抗小鼠 IgG II 抗, 稀释度为 1:40, 避光、置湿盒内 37℃ 孵育 1 h, 磷酸盐缓冲液冲洗后滴加 DAPI 染色液反应 10 min, 磷酸盐缓冲液冲洗后甘油封片。(2) 激光共聚焦扫描显微镜检测: 光源分别采用 561 nm 和 405 nm 波长的激光器激发红色和蓝色荧光, EMA 相对荧光强度检测结果以平均荧光强度表示。脑膜癌病组和对照组各随机选择 200 个高倍($\times 400$) 视野进行细胞计数, 计算每个细胞内 EMA 表达水平的相对荧光强度值, 同时测定细胞面积及周长的平均值和标准差。

三、统计分析方法

采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据计算与分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数间的比较采用 t 检验; 计数资料以相对数构成比(%) 或率(%) 表示, 阳性率之间的比较行 χ^2 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、肿瘤细胞 EMA 表达部位及形态学观察

镜下观察显示, 脑膜癌细胞体积较大, 胞质内可见分布均匀的红色荧光, 提示 EMA 表达于胞质; 其余淋巴细胞或单核细胞等仅见 DAPI 染色的蓝色细胞核, 胞质未着色(图 1)。对照组脑脊液细胞仅见呈蓝色的细胞核, 胞膜、胞质及胞核内未见红色荧光, 提示无 EMA 表达(图 2)。与对照组相比, 脑膜癌病组细胞 EMA 相对荧光强度显著增强($P < 0.01$), 细胞面积和周长增加, 组间差异均有统计学意义($P < 0.01$, 表 1)。

二、免疫荧光细胞化学与激光扫描共聚焦显微技术联合检测

联合检测显示, 20 例脑膜癌病患者中 18 例 EMA 表达阳性, 阳性检出率为 90%; 而常规 MGG 染色仅 12 例 EMA 表达阳性, 阳性率为 60%; 两种检测方法相比, 联合检测组肿瘤细胞 EMA 表达阳性率高于常规 MGG 染色, 组间差异具有统计学意义($\chi^2 = 4.800, P = 0.010$)。

讨 论

脑膜癌病是由于恶性肿瘤在脑、脊髓蛛网膜下

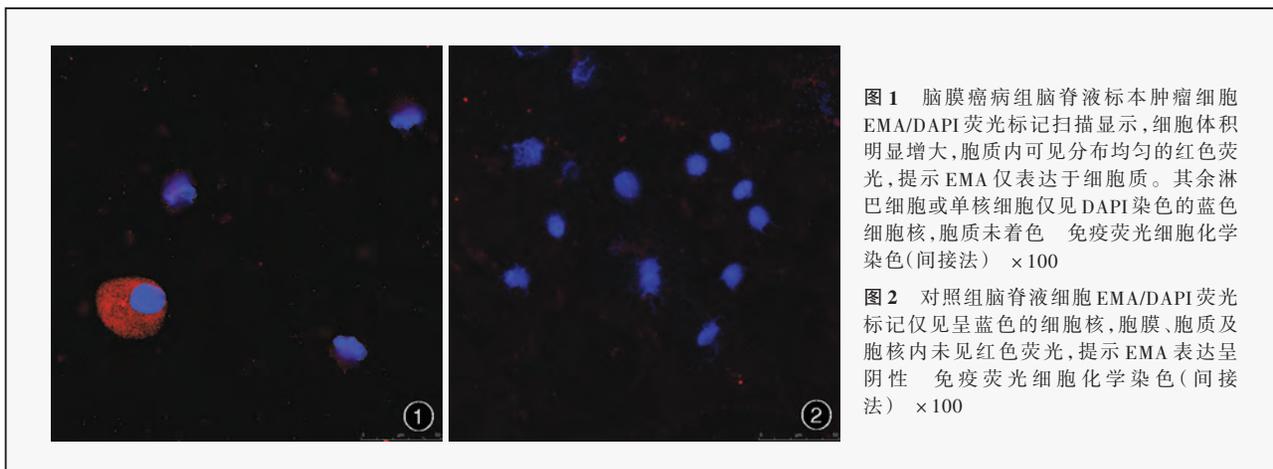


图1 脑膜癌病组脑脊液标本肿瘤细胞 EMA/DAPI 荧光标记扫描显示,细胞体积明显增大,胞质内可见分布均匀红色荧光,提示 EMA 仅表达于细胞质。其余淋巴细胞或单核细胞仅见 DAPI 染色的蓝色细胞核,胞质未着色 免疫荧光细胞化学染色(间接法) × 100

图2 对照组脑脊液细胞 EMA/DAPI 荧光标记仅见呈蓝色的细胞核,胞膜、胞质及胞核内未见红色荧光,提示 EMA 表达呈阴性 免疫荧光细胞化学染色(间接法) × 100

表1 脑膜癌病组和对照组脑脊液细胞 EMA 相对荧光强度及形态学参数的比较($\bar{x} \pm s$, 相对测值)

组别	细胞数	红色荧光强度	细胞面积	细胞周长
对照组	200	3.98 ± 1.58	2 600.40 ± 792.01	200.26 ± 30.11
脑膜癌病组	200	44.84 ± 13.05	18 759.96 ± 7464.69	549.27 ± 110.83
t 值		43.954	30.444	42.978
P 值		0.001	0.005	0.001

隙和软脑膜内弥漫性转移,并随血管周围间隙侵入脑皮质而引起的一系列临床综合征,其在肿瘤患者中的发生率为 5%~8%,恶性程度极高,平均生存期仅 4~11 周。随着临床医师对该病认识的提高和治疗方法的改进,肿瘤患者的生存期逐渐延长,从而使脑膜癌病的患病率呈上升趋势^[1]。脑膜癌病临床表现复杂多样且无特异性,影像学检查对其诊断与鉴别诊断无特异性,因此脑脊液检测脑膜癌细胞是诊断该病的最终标准^[2]。据文献报道^[3-4],脑膜癌病患者首次腰椎穿刺发现肿瘤细胞的阳性率仅为 45%~60%。如前文所述,常规 MGG 染色阳性率仅为 60%,与上述文献报道相近。多次脑脊液检测虽可提高阳性检出率但易延误诊治,同时增加患者痛苦。由于常规 MGG 染色仅能进行细胞形态学观察,而对肿瘤细胞良恶性质却存在较大的局限性,因此需要寻找一种灵敏度更高的诊断方法。

免疫细胞化学技术是通过选择不同的单克隆抗体与特异性肿瘤标志物相结合,经显色后使肿瘤细胞内相应结构呈现不同颜色,据此而作出诊断。因此,选择合适的肿瘤标志物进行免疫组织化学染色对结果的判定十分重要。上皮膜抗原是从人乳脂小球膜上分离获得的糖蛋白的总称,广泛存在于

人体各种上皮细胞中,其分布与细胞角蛋白极为相似,但对内脏腺上皮的表达优于细胞角蛋白。由于上皮膜抗原在肿瘤组织中发生异常糖基化和不完全糖基化,使其核心蛋白暴露出新的蛋白表位或新的糖抗原,尤其在细胞分化较差的肿瘤组织中呈强表达,是上皮来源恶性肿瘤的特异性抗原之一^[5]。有研究结果显示,应用上皮膜抗原等抗原进行免疫组织化学染色可显著提高脑膜癌病的诊断率, Jorda 等^[6]对 38 例临床疑似脑膜癌病患者的脑脊液标本进行研究,结果表明采用免疫细胞化学方法检测上皮膜抗原等抗原,可使脑脊液细胞学检出肿瘤细胞的灵敏度由 57%提高至 83%;庄建华等^[7]报告,常规脑脊液细胞学检测对肿瘤细胞的阳性检出率约为 39.13%,而采用上皮膜抗原免疫细胞化学法则可将阳性检出率提高至 86.96%。但是免疫细胞化学方法也有其局限性,只能根据阳性标准简单地进行阳性或阴性判断,不能提供抗原表达的准确定量信息,故亦无法揭示肿瘤细胞的微结构。

激光扫描共聚焦显微镜采用点光源代替场光源,使探测点与照明点共轭,从而有效地抑制了非焦平面的荧光干扰,使侧向和轴向分辨力显著提高;与此同时,采用激光作为光源对组织标本进行光学切片,并通过 Z 扫描技术自动完成三维数据采集,直接输入计算机图像处理系统获得细胞或组织内微结构的立体和三维图像,于亚细胞和分子水平观察细胞形态,以及细胞器等的变化^[8-10]。应用免疫荧光细胞化学技术将荧光素标记于抗原-抗体复合物并通过激光扫描共聚焦显微镜观察标本时,荧光素受激发光的照射发出不同颜色的荧光,进而确定抗原或抗体的性质、分布及表达水平。近年来,激光扫描共聚焦显微镜广泛应用于神经系统和肿

瘤研究领域,对抗原分布、基因表达、亚细胞结构特征、药物作用机制等进行了多方面研究,诸如:采用免疫荧光双标记法和激光扫描共聚焦显微技术对脑膜血管外皮细胞瘤中的抑癌基因、HDM2 及 E2F1 表达水平进行研究^[11-12],或针对脑脊液淋巴细胞白血病患者细胞线粒体进行的立体、定量研究^[13]。但是,鲜见此项技术在脑膜癌病中的应用报道。

由于在脑膜癌病的组织来源中上皮来源的肿瘤细胞,尤其是腺癌细胞占绝大多数,故本研究以上皮膜抗原作为免疫细胞化学肿瘤标志物,通过激光扫描共聚焦显微镜可见脑膜癌细胞体积较大,呈圆形或卵圆形;核大、圆形或不规则,含较多染色质,核质比例失调,明显异于对照组细胞,与一般肿瘤细胞的特点一致^[14]。在免疫细胞化学研究中,抗原的定位除了与抗原本身表达部位相关外,还与标本的固定效果、抗体滴度、特异性、交叉反应相关。阳性表达也必须在细胞特定的抗原部位,若肿瘤标志物所表达的部位与抗原所在部位不一致,即使呈阳性反应亦不能作为诊断依据^[15-16]。我们采用冷丙酮固定脑脊液标本,单克隆抗体稀释度为 1:200,获得较满意的标记效果,激光扫描共聚焦显微镜下可见上皮膜抗原均匀分布于胞质和胞膜,胞核内基本无分布。而且,我们在荧光定量测量过程中还发现对照组淋巴细胞、单核细胞及中性粒细胞面积和周长相对较小(2600.40 ± 792.01 、 200.26 ± 30.11),肿瘤细胞上皮膜抗原表达水平极低(3.98 ± 1.58);而脑膜癌细胞的面积和周长相对较大($18\ 759.96 \pm 7464.69$ 和 549.27 ± 110.83),胞膜和胞质上皮膜抗原表达水平显著升高(44.84 ± 13.05),与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。由此可见,激光扫描共聚焦显微技术联合免疫细胞化学染色方法对测定肿瘤细胞上皮膜抗原表达水平、鉴别上皮来源的恶性肿瘤细胞,尤其是对未发现原发病灶的脑膜癌病具有重要临床意义。本研究纳入的 20 例脑膜癌病患者中 18 例上皮膜抗原表达阳性,阳性率高达 90%;而常规 MGG 染色仅 12 例呈阳性反应,阳性检出率 60%,两种检测方法比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示:与常规 MGG 染色相比,免疫细胞化学染色可显著提高脑膜癌病的诊断率,而且上皮膜抗原可作为脑膜癌病免疫细胞化学检测的首选肿瘤标志物。我们认为,对颅内高压症状突出且头部 CT 或 MRI 检查无异常的头颅、定性困难的脑膜炎患者,均应高度警惕脑膜癌病的可能,应尽早行脑

脊液细胞学检查,结合激光扫描共聚焦显微技术以明确诊断^[17]。

免疫荧光细胞化学与激光扫描共聚焦显微技术联合检测,能够对肿瘤细胞抗原表达、分布、细胞结构特征进行定量观察和监测,应用于脑脊液脑膜癌病的研究必将对脑膜癌病的诊断、脑脊液细胞学的深入研究开辟一条新的研究途径。

参 考 文 献

- [1] Sulim S, Høyer M. Meningeal carcinomatosis. *Ugeskr Laeger*, 2005, 167:3481-3484.
- [2] Pavlidis N. The diagnostic and therapeutic management of leptomeningeal carcinomatosis. *Ann Oncol*, 2004, 15 Suppl 4: 285-291.
- [3] 王新高, 赵性泉, 王拥军. 提高脑膜癌病的诊断水平. *疑难病杂志*, 2004, 3:321-322.
- [4] 邱雯静, 杨欢, 杨乐, 等. 脑膜癌病的临床特点及脑脊液检查对其诊断的重要意义. *卒中与神经疾病*, 2007, 14:217-219.
- [5] 孙善平, 臧益秀, 王晓, 等. 乳腺癌患者外周血 EMA、EGP-2 和 CK19 的检测及其临床意义. *山东大学学报(医学版)*, 2008, 46:395-398.
- [6] Jorda M, Ganjei-Azar P, Nadji M. Cytologic characteristics of meningeal carcinomatosis: increased diagnostic accuracy using carcinoembryonic antigen and epithelial membrane antigen immunocytochemistry. *Arch Neurol*, 1998, 55:181-184.
- [7] 庄建华, 李焰生, 倪麟, 等. 上皮膜抗原免疫细胞化学检查在脑膜癌病中的诊断价值. *临床神经病学杂志*, 2005, 18:54-56.
- [8] 王春梅. 激光扫描共聚焦显微技术. 西安: 第四军医大学出版社, 2004: 3.
- [9] 王春梅. 激光扫描共聚焦显微技术. 西安: 第四军医大学出版社, 2004: 296.
- [10] Lee SC, Bajcsy P. Feature based registration of fluorescent LSCM imagery using region centroids. *Proc SPIE*, 2005, 5747: 170-181.
- [11] Martínez JC, Palomino JC, Cabello A, et al. HDM2 overexpression and focal loss of p14/ARF expression may deregulate the p53 tumour suppressor pathway in meningeal haemangiopericytomas: study by double immunofluorescence and laser scanning confocal microscopy. *Histopathology*, 2005, 46:184-194.
- [12] Martínez JC, Palomino JC, Samaniego R, et al. Retinoblastoma (Rb) tumor - suppressor pathway alterations in meningeal hemangiopericytomas: high E2F transcription factor 1 expression and loss of Rb expression: study by double immunofluorescence staining and laser - scanning confocal microscopy. *Cancer*, 2008, 113:166-174.
- [13] 岳剑宁, 孔繁元, 吴若芬, 等. 应用共聚焦激光扫描显微镜对脑脊液淋巴白血病患者细胞线粒体的研究. *北京医学*, 2005, 27: 211-213.
- [14] 李茂绪. 神经系统疾病实验室诊断学. 济南: 山东大学出版社, 2006: 23.
- [15] 万文徽. 肿瘤标志临床应用与研究进展. 北京: 北京大学医学出版社, 2005: 2.
- [16] 万文徽. 肿瘤标志临床应用与研究进展. 北京: 北京大学医学出版社, 2005: 154.
- [17] 马静萍. 脑膜癌病的临床特征及误诊原因分析. *中国现代神经疾病杂志*, 2004, 4:301-304.

(收稿日期:2011-09-30)